

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Daun waru yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Ngebel, Kasihan Bantul. Tanaman daun waru dideterminasi untuk memastikan kebenaran sampel. Determinasi tanaman dilakukan di bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Hasil dari determinasi tanaman menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah daun waru dengan nama latin *Hibiscus tiliaceus* L termasuk ke dalam suku Malvaceae. Surat keterangan determinasi tanaman dapat dilihat pada lampiran 3.

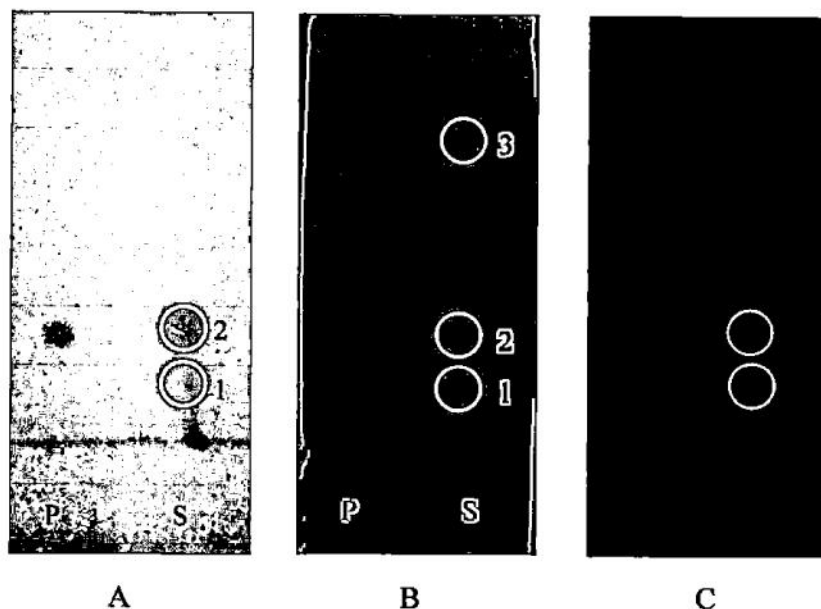
2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk simplisia daun waru sebesar 1.250 gram diperoleh dari 4.000 gram daun waru. Serbuk simplisia daun waru diekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia ke dalam etanol selama 5 hari sambil sesekali diaduk, tujuan pengadukan adalah agar dapat terjadi keseimbangan konsentrasi golongan senyawa aktif yang lebih cepat di dalam cairan. Pemekatan dilakukan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 60 rpm bertujuan agar golongan senyawa yang ada dalam daun waru tidak mudah rusak. Ekstrak kental yang dihasilkan dalam penelitian ini sebanyak 193,5

gram. Secara makroskopis FEDW berwarna coklat tua dengan bau yang khas. Sebanyak 2/3 bagian ekstrak kental digunakan untuk fraksinasi. Proses fraksinasi dilakukan secara bertingkat dengan pelarut etanol dan kloroform. FEDW yang diperoleh setelah diuapkan adalah 72,40 gram dengan rendemen sebesar 56,12%.

3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

FEDW hasil dari proses ekstraksi akan diidentifikasi adanya kandungan flavonoid yang diduga merupakan senyawa yang berperan sebagai antioksidan. Identifikasi flavonoid dalam FEDW dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Lempeng KLT yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah campuran etil asetat : asam asetat glasial : asam format : air dengan perbandingan 100 : 11 : 11 : 27. Hasil identifikasi kandungan flavonoid dengan KLT dalam FEDW yang diuapi dengan uap amoniak serta menggunakan pembanding rutin menunjukkan terbentuknya 3 noda yang terpisah di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Profil dari kromatogram hasil KLT FEDW dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Profil kromatogram hasil KLT FEDW

Keterangan :

Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄

Fase gerak : Etil asetat : Asam asetat glasial : Asam format : Air (100 : 11 : 11 : 27).

Sampel : P = Pembanding Rutin
S = FEDW

Pereaksi : Uap Amoniak

Deteksi : (A) Visibel (B) UV 254 nm (C) UV 366 nm

Adapun nilai Rf dari masing-masing bercak disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 3. Nilai Rf FEDW

Nomor Bercak	Rf	Warna Noda		
		Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,14	Kuning	Peredaman	Ungu tua
2	0,29	Kuning	Peredaman	Ungu tua
3	0,8	-	Peredaman	Ungu tua

Pada pengamatan kromatogram memperlihatkan adanya bercak sampel berwarna kuning setelah diuapi amoniak pada pengamatan secara visibel begitu pula pada pembanding rutin. Pengamatan di bawah sinar UV 254 bercak No. 2

mengalami peredaman dan dibawah sinar UV 366 nm terlihat warna ungu tua. Semua flavonoid akan memberikan fluoresensi lembayung gelap, biru, kuning, dan hijau di bawah UV 366 nm (Harborne, 1987). Kromatogram sampel menunjukkan nilai *R_f* bercak No. 2 sebesar 0,29 sedangkan *R_f* pembanding rutin sebesar 0,29. Hasil ini menunjukkan bahwa sampel FEDW mengandung senyawa flavonoid.

4. Uji Antioksidan Metode DPPH

Dalam pengujian aktivitas antioksidan ekstrak uji dan standar rutin sebagai kontrol positif menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH menunjukkan serapan maksimum larutan DPPH berada pada panjang gelombang 516 nm (Lampiran 4). Dilanjutkan dengan penentuan *operating time* dalam selang waktu 120 menit. *Operating time* adalah rentang waktu pada saat absorbansi larutan stabil, dihitung mulai dari larutan uji maupun rutin direaksikan dengan DPPH. Berdasarkan hasil pengujian diketahui bahwa, absorbansi pada FEDW stabil pada menit ke 40, sedangkan absorbansi rutin stabil pada menit ke 90. Sampel dibaca pada waktu operasional sebab pada saat tersebut absorbansi yang terbaca oleh spektrofotometer nilainya stabil. Hasil pengujian waktu operasional rutin dan larutan uji selengkapnya tertera pada Lampiran 5 dan 6.

Aktivitas antioksidan dari larutan uji dapat dianalisis dari data hasil pengukuran absorbansi DPPH dengan adanya penambahan masing-masing larutan uji FEDW dan rutin sebagai kontrol positif yang dibandingkan terhadap

kontrol DPPH. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung persentase inhibisi. Persen inhibisi serapan DPPH pada penelitian tertera pada Tabel 4 dan Tabel 5.

Tabel 4. Persen inhibisi serapan DPPH larutan rutin.

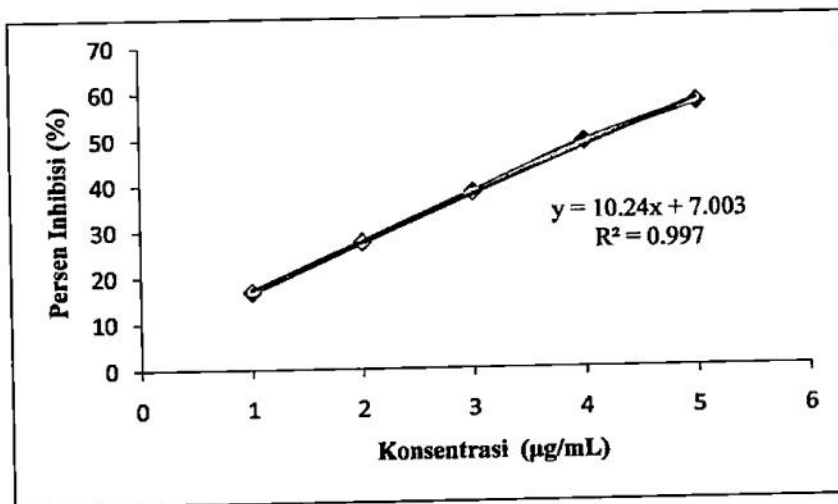
Replikasi	Persen Inhibisi DPPH (%)				
	1 µg/ml	2 µg/ml	3 µg/ml	4 µg/ml	5 µg/ml
1	18,35	27,29	38,17	49,15	57,19
2	16,76	27,41	38,05	49,04	57,19
3	16,08	27,52	38,17	49,15	57,30
4	16,08	27,52	38,17	48,70	57,30
Rata-rata	16,82	27,44	38,14	49,01	57,25
SD	1,071	0,110	0,060	0,213	0,064

Tabel 5. Persen inhibisi serapan DPPH larutan FEDW

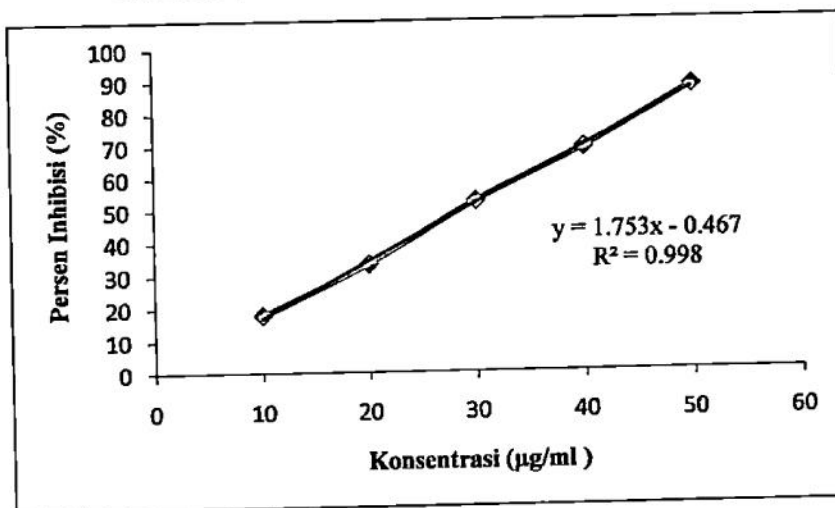
Replikasi	Persen Inhibisi DPPH (%)				
	10 µg/ml	20 µg/ml	30 µg/ml	40 µg/ml	50 µg/ml
1	23,40	38,68	52,44	74,20	87,45
2	18,54	38,17	52,64	71,67	86,95
3	23,20	39,39	52,34	71,26	87,96
4	17,94	33,42	52,54	68,93	87,86
Rata-rata	20,77	37,42	52,49	71,52	87,55
SD	2,933	2,710	0,129	2,159	0,460

Berdasarkan data-data dari Tabel 4 dan Tabel 5 diketahui bahwa semakin besar konsentrasi larutan uji dan kontrol positif, maka persentase penangkapan radikal bebas DPPH adalah semakin besar. Semakin besar konsentrasi larutan uji maka semakin banyak senyawa antioksidan yang bereaksi dengan radikal bebas DPPH. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa harga IC_{50} berbanding terbalik dengan kemampuan senyawa untuk

menangkap radikal DPPH. Grafik hubungan konsentrasi larutan uji dengan persen inhibisi dapat diperoleh dengan memplotkan nilai dari persen inhibisi dan konsentrasi larutan uji, sehingga diperoleh suatu kurva regresi linier. Kurva hasil uji aktivitas antioksidan FEDW dan rutin dapat dilihat pada Gambar 7 dan 8.



Gambar 7. Aktivitas antioksidan senyawa rutin



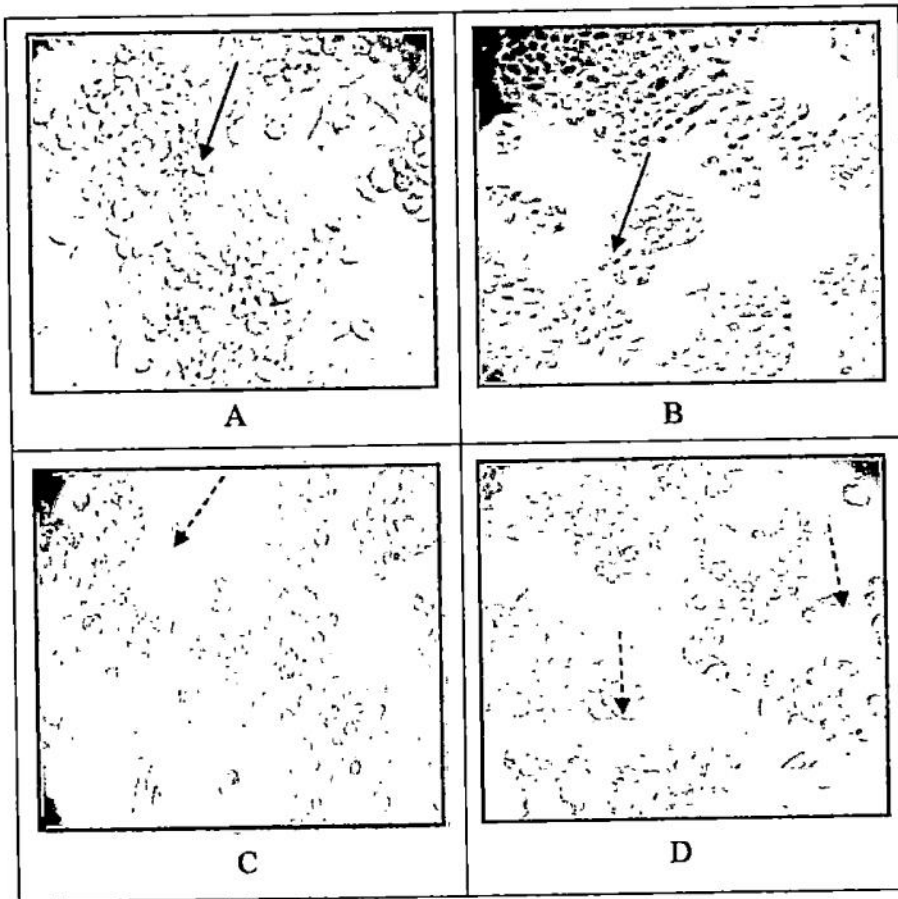
Gambar 8. Aktivitas antioksidan FEDW

Dari persamaan regresi dapat dihitung nilai IC_{50} , fraksi etanol memiliki nilai IC_{50} sebesar 28 $\mu\text{g/ml}$. Menurut Mardawati, *et al.* (2008) hasil uji aktivitas antioksidan terlihat bahwa FEDW memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat yang relatif lebih besar dari rutin yang memiliki IC_{50} sebesar 4 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan bahwa rutin sebagai kontrol positif memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibanding FEDW.

IC_{50} yang diperoleh dianalisis menggunakan program SPSS menggunakan metode uji (*Independent Sample t Test*), untuk mengetahui perbedaan antara dua kelompok yaitu antara IC_{50} FEDW dengan IC_{50} rutin. Hasil uji menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Hasil menunjukkan bahwa pada uji *levene's test* nilai F hitung adalah 13,940 dengan probabilitas 0,010 ($p < 0,05$), maka kedua kelompok IC_{50} memiliki variansi yang berbeda. Hasil uji nilai t hitung kelompok IC_{50} adalah 51,590 dengan probabilitas 0,000 ($p < 0,05$), yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna antara IC_{50} FEDW dengan IC_{50} rutin (Lampiran 13)

5. Uji Sitotoksik

Aktivitas sitotoksik FEDW terhadap sel HeLa dapat diamati dari perubahan morfologi sel setelah 24 jam perlakuan. Sel mengalami perubahan bentuk menjadi tidak bulat lagi dengan kepadatan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol sel yang dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Efek FEDW terhadap Sel HeLa.

A. Kontrol sel HeLa

B. Perlakuan FEDW kadar 62,5 µg/mL terhadap sel HeLa

C. Perlakuan FEDW kadar 250 µg/mL terhadap sel HeLa

D. Perlakuan FEDW kadar 1000 µg/mL terhadap sel HeLa

—→ Sel HeLa hidup

---→ Sel HeLa yang mati

Berdasarkan Gambar 9(A) Menunjukkan pada kontrol sel, sel HeLa tumbuh banyak, yang digambarkan sebagai bulatan-bulatan jernih, bergerombol, tidak keruh pada bagian inti dan tidak lisis. Pada Gambar 9(B) Kadar terendah FEDW yaitu 62,5 µg/mL, menunjukkan adanya proliferasi sel

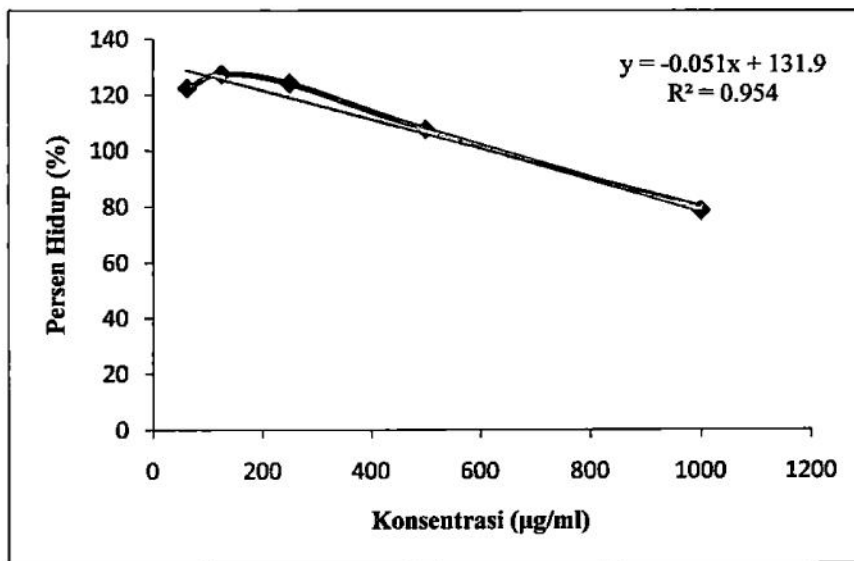
dimana jumlah sel dengan perlakuan lebih banyak dibanding kontrol. Terlihat pada Gambar 9(D), semakin bertambahnya kadar yaitu pada kadar 1000 $\mu\text{g/mL}$ kepadatan sel berkurang, terlihat lebih gelap, terlihat sel semakin banyak yang tidak berbentuk bulat lagi ini menunjukkan bahwa sel lebih banyak yang mati. Pada penelitian ini masing-masing subyek dilakukan replikasi 3 kali. Hasil dari uji sitotoksik dengan metode MTT berupa nilai absorbansi dari masing-masing larutan uji dengan beberapa konsentrasi. Nilai absorbansi dari larutan uji dengan beberapa konsentrasi yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai % hidup sel. Nilai % hidup sel HeLa dengan pemberian FEDW dengan beberapa konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Persen Hidup Sel HeLa dengan berbagai konsentrasi FEDW

Replikasi	Persen Hidup Sel HeLa (%)				
	62,5 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
1	121,15	127,68	124,79	106,32	76,93
2	118,89	129,56	121,27	107,08	78,06
3	126,93	124,79	125,80	109,30	80,95
Rata – rata	122,32	127,34	123,95	107,57	78,65
SD	4,146	2,403	2,378	1,548	2,073

Tabel 6 menunjukkan bahwa pada konsentrasi rendah tidak terdapat sel yang mati namun fraksi etanol pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ memperlihatkan adanya kematian sel. Efek sitotoksik FEDW terbesar terdapat pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ dengan persentase sel HeLa yang hidup sebesar 78,65%; sedangkan

pada konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ persentase sel HeLa yang hidup sebesar 122,32%. Penurunan persen hidup sel HeLa mulai tampak pada konsentrasi 125 - 500 $\mu\text{g/ml}$ tetapi masih diatas 100%, sehingga masih ada proliferasi sel tetapi tidak signifikan. Fraksi uji pada penelitian ini menunjukkan efek sitotoksik yang rendah terhadap sel HeLa meskipun perlakuan fraksi uji pada konsentrasi tertinggi yaitu 1000 $\mu\text{g/ml}$ menyebabkan kematian terhadap sel HeLa. Grafik hubungan konsentrasi FEDW dengan persen hidup sel HeLa dapat diperoleh dengan memplotkan nilai dari persen sel hidup dan konsentrasi FEDW, sehingga diperoleh suatu kurva regresi linier. Kurva hasil uji aktivitas sitotoksik FEDW dapat dilihat pada Gambar 10.



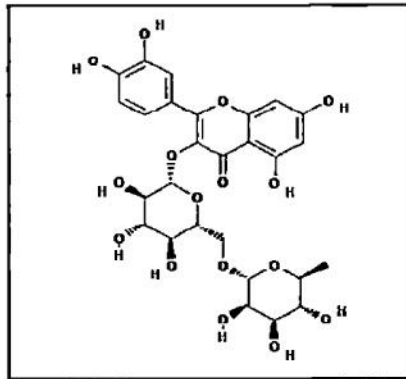
Gambar 10. Uji aktivitas sitotoksik FEDW

Dari persamaan regresi dapat dihitung nilai IC_{50} FEDW memiliki nilai IC_{50} sebesar 1605 $\mu\text{g/ml}$. Menurut Weerapreeyakul, *et al.* (2012) FEDW yang

memiliki nilai IC_{50} sebesar 1605 $\mu\text{g/mL}$, mempunyai aktivitas sitotoksik yang tergolong kurang toksik terhadap sel kanker serviks HeLa:

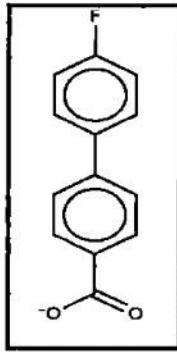
6. *Molecular Docking*

Dalam uji *in silico* (*docking*) dipelajari interaksi senyawa rutin terhadap Bcl-xl suatu protein yang berperan dalam proses apoptosis, senyawa rutin sebagai inhibitor Bcl-xl. Proses *docking* diawali dengan preparasi ligan uji yaitu rutin dengan menggambarkan molekul ligan uji secara manual pada jendela *MarvinSketch* seperti yang terlihat pada Gambar 11.



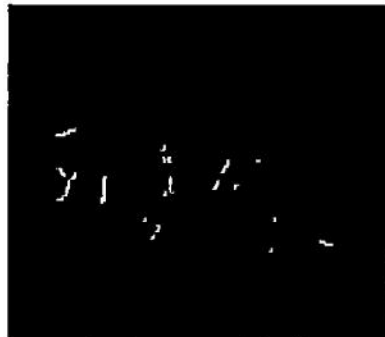
Gambar 11. Struktur senyawa rutin

Docking (*redocking*) dilakukan dengan melakukan *docking native ligand* pada reseptor. *Native ligand* dibuat seperti halnya pada preparasi senyawa uji di atas. Validasi metode *docking* yang dilakukan dengan *redocking native ligand* pada *binding site* untuk mendapatkan nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Molekul *native ligand* seperti yang terlihat pada gambar 12.



Gambar 12. *Native ligand* 4FC (4'-fluoro-1,1'-biphenyl-4-carboxylic acid)

Nilai RMSD yang diperoleh sebesar 0,3111 yang berarti metode memiliki nilai validitas yang tinggi yang dibuktikan dengan nilai RMSD < 2, artinya posisi *ligand copy* mirip dengan *native ligand*. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa pose ligan yang diprediksi semakin baik karena semakin mendekati konformasi *native*. Hal ini ditunjukkan pada gambar 13.



Gambar 13. Pose *native ligand* 4FC dan pose prediksi *docking* dari simulasi *docking*. *Native ligand* (atom karbon diperlihatkan dengan warna biru muda), pose prediksi *docking* dari simulasi *docking* (atom karbon diperlihatkan dengan warna ungu). Atom Nitrogen diperlihatkan dengan warna biru, atom oksigen diperlihatkan pada warna merah, atom Flour diperlihatkan dengan warna hijau.

Hasil *docking* berupa *score* yang menggambarkan kekuatan ikatan paling stabil antara ligan dan reseptor. Semakin kecil *score* yang diperoleh, maka ikatan antara ligan dan reseptor semakin stabil. *Score* hasil *docking native*

ligand dan ligan uji dengan Bcl-xl dapat dilihat pada tabel 7.

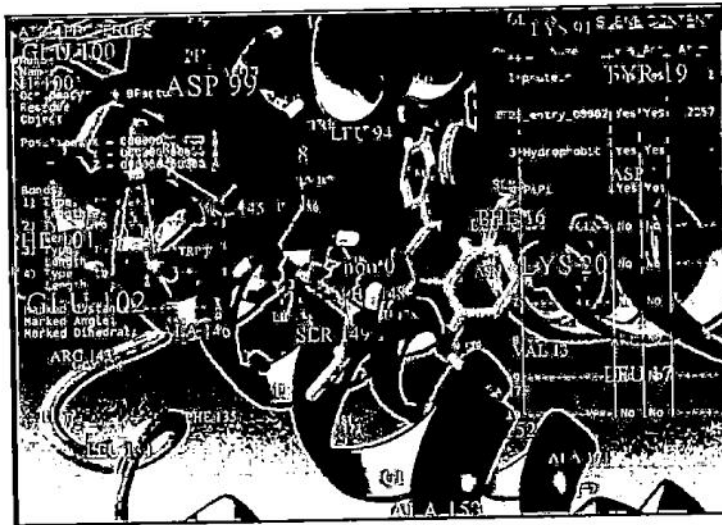
Tabel 7. *Score* hasil *docking native ligand* dan ligan uji dengan Bcl-xl

<i>Ligand</i>	<i>Score docking terhadap Bcl-xl</i>
<i>Native Ligand (4FC)</i>	-83,6148
Rutin	-91,210

Dari hasil *docking* yang memprediksi interaksi senyawa rutin dengan Bcl-xl terlihat bahwa rutin memperoleh *score* sebesar -91,210 yang memiliki *score* yang lebih rendah daripada ikatan Bcl-xl dengan *native ligand* (4FC). Hal ini menunjukkan bahwa kompleks ikatan protein dengan rutin masih lebih stabil (kuat) dibandingkan dengan kompleks antara protein dengan *native ligand* sehingga diprediksikan menyebabkan aktivitas inhibitor terhadap Bcl-xl lebih tinggi. Ikatan antara *native ligand* dan rutin dengan Bcl-xl dapat ditunjukkan pada gambar 14 dan 15.

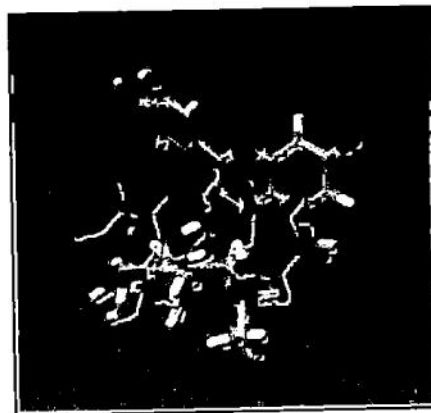


Gambar 14. Hasil *molecular docking* 3 dimensi dengan PLANTS *native ligand* dan Bcl-xl.



Gambar 15. Hasil *molecular docking* tiga dimensi dengan PLANTS senyawa rutin dan Bcl-xl.

Konformasi rutin paling optimal yang menghasilkan nilai terendah diposisikan dengan ligan spesifik (*native ligand*). Dengan model 3D dapat dilihat visualisasi rutin dan *native ligand* untuk memprediksi struktur dari rutin yang bersesuaian dengan *native ligand* 4FC dari Bcl-xl.



Gambar 16. Visualisasi 3D *native ligand* dan rutin. *Native ligand* diperlihatkan dengan warna magenta. Atom C3, C4, A5 dari rutin membentuk struktur yang bersesuaian dengan struktur *native ligand* 4FC.

B. Pembahasan

Pemahaman tentang proses karsinogenesis merupakan pengembangan strategi dalam pengobatan penyakit kanker. Pendekatan terapi kanker menggunakan agen kemopreventif semakin berkembang terutama senyawa-senyawa berasal dari bahan alam dan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Agen kemopreventif didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menghambat dan menekan proses karsinogenesis pada manusia sehingga pertumbuhan kanker dapat dicegah. Salah satu yang dapat digunakan sebagai agen kemopreventif yaitu daun waru. Daun waru mengandung kandungan senyawa flavonoid, dimana senyawa golongan flavonoid merupakan senyawa yang paling banyak diteliti aktivitas kemoprevensinya (Chang *et al.*, 2001). Dengan adanya ketertarikan terhadap senyawa yang diduga mampu menghambat pertumbuhan sel kanker yaitu flavonoid mendasari pemilihan penyari yang digunakan untuk ekstraksi. Senyawa flavonoid dapat bersifat polar atau semipolar, sehingga digunakan etanol 70%. Penggunaan etanol 70% akan lebih efektif mengacu pada sifat polar etanol dalam mengekstrak senyawa flavonoid karena tingkat kepolaran etanol lebih rendah dibandingkan air. Hal ini akan mengakibatkan dinding sel tumbuhan yang bersifat kurang polar lebih mudah didegradasi dan senyawa flavonoid akan lebih mudah keluar dari sel tanaman (Tiwari *et al.*, 2011). Usaha penemuan agen kemopreventif yang spesifik dan selektif pada daun waru dilakukan dengan fraksinasi dengan tujuan menyederhanakan senyawa metabolit sekunder yang terekstraksi untuk mengetahui senyawa aktif yang berperan sebagai kemopreventif.

Upaya untuk mengetahui mekanisme aksi FEDW sebagai agen kemopreventif harus diawali dengan identifikasi kandungan senyawa dalam fraksi tersebut. Identifikasi senyawa yang dilakukan dengan menggunakan KLT menunjukkan bahwa dalam FEDW mengandung flavonoid. Apabila dalam ekstrak ada senyawa flavonoidnya maka bisa diprediksi kemungkinan mekanisme penghambatannya terhadap pertumbuhan kanker. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan bercak berwarna kuning setelah menggunakan uap amoniak pada sinar tampak. Berdasarkan literatur, senyawa flavonoid memberikan warna kuning, hijau kuning, coklat tua, coklat kuning, kuning murup setelah menggunakan uap amoniak (Harborne, 1987). Serta dapat terlihat dari nilai Rf FEDW dan pembanding rutin yang sama yaitu sebesar 0,26.

Pengujian aktivitas antioksidan FEDW menggunakan metode DPPH memberikan nilai IC_{50} sebesar 28 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan Mardawati, *et al.* (2008) FEDW memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong sangat kuat. Meskipun FEDW memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat tetapi FEDW masih memiliki nilai IC_{50} yang lebih besar jika dibandingkan dengan rutin sebagai pembandingnya yaitu 4 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan aktivitas penangkapan radikal bebas rutin lebih besar dari FEDW. Ini dapat disebabkan karena rutin merupakan senyawa yang lebih murni dibandingkan dengan fraksi yang diuji. Rutin dipilih karena rutin ditemukan pada tumbuhan dan diketahui mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi.

Adanya kandungan flavonoid pada FEDW berpotensi sebagai antioksidan. Aqil, *et al.* (2006) melaporkan bahwa flavonoid dari beberapa tanaman obat di India menunjukkan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Flavonoid yang kehilangan atom H akan menjadi radikal bebas baru tetapi karena adanya efek resonansi inti aromatik maka flavonoid menjadi tidak reaktif (stabil). Aktivitas penangkapan radikal bebas oleh senyawa antioksidan dapat dipantau dari berkurangnya intensitas warna ungu larutan DPPH. Pengurangan intensitas warna ungu dapat disebabkan oleh donasi hidrogen dari senyawa antioksidan kepada radikal DPPH sehingga terbentuk senyawa DPPHidrazin (stabil) berwarna kuning jika senyawa antioksidan tersebut adalah flavonoid. Adanya senyawa golongan flavonoid pada FEDW yang menyebabkan aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH. Mekanisme antioksidan terhadap radikal DPPH dengan memberikan elektron pada radikal DPPH sehingga menjadi molekul yang lebih stabil. Flavonoid dapat menetralkan radikal bebas dengan memberikan elektronnya bagi radikal bebas penginisiasi terjadinya reaksi peroksidasi lipid.

Neoplasia serviks berhubungan dengan inflamasi berlebihan hasil dari stress oksidatif oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*), dimana serangan ROS menyebabkan stres oksidatif (Singh *et al.*, 2007). Aktivitas radikal bebas hasil peroksidasi lipid akan menyebabkan banyak kerusakan patologis dimana akumulasi kerusakan akibat radikal bebas pada jaringan *in vivo* antara lain menyebabkan kanker, inflamasi dan aterosklerosis. Banyak penelitian melaporkan bahwa aktivitas antioksidasi enzimatis yang ada dalam tubuh tidak mencukupi

untuk menetralkan radikal bebas yang ada dalam tubuh. Sehingga diharapkan dengan adanya substansi flavonoid pada FEDW dapat mencegah peroksidasi dengan memodifikasi pengemasan lipid dan penurunan fluiditas membran. Perubahan ini dapat menghambat difusi radikal bebas dan memutuskan reaksi peroksidasi (Blokina *et al.*, 2003). Dimana flavonoid yang bersifat lebih hidrofilik berinteraksi dengan bagian kepala yang bersifat polar dari lipid membran melalui ikatan hidrogen. Interaksi ini menyebabkan perlindungan membran bilayer dari serangan dari luar ataupun dari dalam misalnya oksidan (Oteiza *et al.*, 2005).

Aktivitas sitotoksik FEDW pada sel HeLa diketahui melalui nilai IC_{50} yaitu konsentrasi dimana 50% sel HeLa mati atau tidak viabel setelah diberikan perlakuan. FEDW menunjukkan nilai IC_{50} 1605 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} tersebut cukup besar sehingga dapat dikatakan FEDW mempunyai aktivitas sitotoksik yang tergolong kurang toksik terhadap sel kanker serviks HeLa. Profil persen hidup sel HeLa menunjukkan adanya proliferasi dari sel HeLa yang cukup signifikan pada konsentrasi $\leq 500 \mu\text{g/ml}$. Hal ini dapat dilihat dari persentase sel hidup akibat perlakuan yang lebih banyak dibandingkan kontrol sel. Hasil penelitian menunjukkan FEDW menyebabkan proliferasi sel dengan persen sel hidup sel HeLa sampai dengan 127,34%. Fenomena ini juga terjadi pada genistein, suatu fitoestrogen yang terdapat pada kedelai (Murkies *et al.*, 1998). Karakteristik dari senyawa fitoestrogen dapat memacu proliferasi sel pada konsentrasi rendah dan

menghambat proliferasi sel pada konsentrasi tinggi atau biasa disebut efek bifasik (This *et al.*, 2001). Efek proliferasi FEDW dimungkinkan karena terdapat senyawa dalam FEDW yang dapat berikatan dengan ER (*Estrogen Receptor*) dan membentuk kompleks fitoestrogen-ER sehingga terjadi pengaktifan reseptor estrogen. Reseptor estrogen yang telah aktif akan berinteraksi dengan ERE (*Estrogen Response Element*) yang terdapat dalam nukleus sehingga mampu menginduksi ekspresi *estrogen responsive gene*, salah satunya adalah protein c-Myc. Protein c-Myc yang terekspresi akan memicu terjadinya daur sel dan meningkatkan proliferasi sel-sel epitelial payudara dan sel-sel uterus (Gruber *et al.*, 2002). Adanya cincin fenol sangat diperlukan untuk berikatan pada sisi ikatan reseptor estrogen yang merupakan struktur kunci yang membuat fitoestrogen dapat berikatan dengan ER dan memperlihatkan efek estrogenik (Yildiz, 2005). Salah satu contoh fitoestrogen adalah senyawa flavonoid yang banyak terdapat dalam tumbuh-tumbuhan (Achadiat, 2003). Kemungkinan besar kandungan flavonoid pada FEDW mampu berinteraksi dengan reseptor estrogen sehingga dapat meningkatkan proliferasi sel.

Dilain sisi pada konsentrasi tinggi 1000 µg/ml FEDW menunjukkan penghambatan proliferasi sel dengan persen hidup sel HeLa sebesar 78,6%. Hal tersebut menunjukkan bahwa FEDW memiliki efek toksik terhadap pertumbuhan sel HeLa. Efek sitotoksik FEDW akan menyebabkan sel HeLa mati yang ditandai dengan perubahan permeabilitas membran sel HeLa. Semakin tinggi konsentrasi

FEDW, perubahan permeabilitas membran sel HeLa yang terjadi semakin besar. Berdasarkan penelitian Murkies, *et al.* (1998) diketahui bahwa fitoestrogen pada kadar rendah menunjukkan efek estrogenik sedangkan pada kadar tinggi menunjukkan efek antiestrogenik sehingga mampu menekan pertumbuhan sel kanker. Pada konsentrasi tinggi FEDW menunjukkan penghambatan proliferasi sel HeLa, kemungkinan aksi penghambatannya dapat bermacam-macam. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa mekanisme penghambatan proliferasi dengan menghambat enzim topoisomerase II, menghambat aktivitas tirosin kinase, melalui aktivitas antioksidan, induksi apoptosis, induksi penghambatan siklus sel dan inhibisi angiogenesis (Liu *et al.*, 2005). Penelitian Shen, *et al.* (1999) menyebutkan bahwa genistein yang tergolong fitoestrogen mampu menghambat aktivitas tirosin kinase, sehingga kemungkinan aksi penghambatan pertumbuhan oleh FEDW juga dengan menghambat aktivitas tirosin kinase.

Mekanisme penghambatan proliferasi yang mungkin lainnya adalah yaitu melibatkan penghambatan proses prooksidan yang menyebabkan promosi tumor. Secara umum dipercaya bahwa pembentukan *growth promoting oxidant* (ROS (*Reactive Oxygen Species*)) merupakan katalis utama pada tahap promosi dan progresi yang mengikuti tahap inisiasi. Sifat antioksidan dari senyawa flavonoid dapat menghambat proses karsinogenesis. Fase inisiasi kanker seringkali diawali melalui oksidasi DNA yang menyebabkan mutasi oleh senyawa karsinogen (Kakizoe, 2003). Karsinogen aktif seperti radikal oksigen, peroksida dan

superoksida, dapat distabilkan oleh flavonoid melalui reaksi hidrogenasi maupun pembentukan kompleks (Ren *et al.*, 2003).

Salah satu jalur mekanisme lain yang mungkin terjadi adalah melalui induksi apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel yang diprogram sebagai respon terhadap rangsangan tertentu. Senyawa flavonoid telah diketahui dapat menginduksi terjadinya apoptosis tetapi mekanisme molekulernya belum diketahui secara pasti (Ren *et al.*, 2003). Apoptosis merupakan metode yang penting untuk kontrol seluler dan gangguan pada proses ini mengakibatkan pertumbuhan sel yang tidak normal (kanker) (Taraphdar, 2001). Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis dapat melalui *down-regulation* ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl dan *up regulation* ekspresi Bax dan Bak (Konig *et al.*, 1997). Apoptosis dikontrol oleh protein Bcl-2 *family*. Beberapa anggota dari family ini antara lain Bcl-2 dan Bcl-xl sebagai protein antiapoptosis, sedangkan Bax, Bak, Bad dan Bid merupakan protein pro apoptosis.

Dalam rangka pengembangan senyawa kemopreventif dengan target aksi yang spesifik, maka selanjutnya diperlukan kajian dan penelusuran mekanisme aksi secara molekuler. Senyawa di dalam FEDW yang diduga mempunyai efek penurunan insidensi kanker adalah senyawa golongan flavonoid. Salah satu senyawa flavonoid yang terkandung di dalam daun *Hibiscus tiliaceus* adalah rutin (Zhen *et al.*, 2008). Aktivasi onkogen yang diekspresikan oleh sel kanker serviks yang diinfeksi HPV seperti E6 dan E7 menyebabkan terjadinya perubahan *epigenetic*. Dimana onkogen E6 dan E7 menghasilkan peningkatan ekspresi

protein Bcl-xl (Aungsumart *et al.*, 2007). Ekspresi berlebihan Bcl-2 dan Bcl-xl diketahui menghambat aktivitas pro-apoptosis dari Bax (Theopilus *et al.*, 2012). Adanya protein proapoptosis seperti Bad dan Bax menyebabkan apoptosis sel, sedangkan apoptosis dihambat oleh protein antiapoptosis seperti Bcl-xl. Oleh karena itu, target penting dalam pengobatan kanker adalah penekanan ekspresi protein antiapoptosis. Penghambatan pertumbuhan kanker oleh protein antiapoptosis yang berperan penting dalam *signal* apoptosis sel salah satunya Bcl-xl.

Penghambatan protein antiapoptosis seperti Bcl-xl menyebabkan peningkatan ekspresi Bax. Bax yang mengalami stimulasi akan mengalami translokasi ke mitokondria dan membentuk saluran pada membran mitokondria menyebabkan pelepasan sitokrom c (Gessner *et al.*, 2002). Pelepasan sitokrom c mencetuskan pertemuan Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor*) dan *pro-caspase 9* untuk membentuk suatu apoptosome. ATP dibutuhkan untuk rekrutmen *pro-caspase 9* oleh Apaf-1 melalui apa yang disebut CARD (*caspase recruiting domain*). Kemudian *pro-caspase 9* secara autolitik dipecah menjadi *caspase 9* aktif, yang kemudian mengaktivasi *pro-caspase 3* menjadi *caspase* aktif yang menghasilkan pemecahan substrat dan apoptosis (Chao *et al.*, 1998).

Hal ini dapat dibuktikan melalui *docking* yang membuktikan bahwa flavonoid rutin mampu berikatan dengan Bcl-xl dengan energi yang lebih rendah dari *native ligand* yaitu sebesar -91,210. Dengan demikian dimungkinkan ligan uji memiliki kemampuan menghambat aktivitas Bcl-xl. Oleh karena itu senyawa rutin

dalam FEDW melalui penelitian ini dapat mengurangi insidensi kanker pada sel HeLa dengan menginduksi apoptosis melalui mekanisme penghambatan protein Bcl-xl. Mukherjee, *et al.* (2010) membuktikan bahwa penghambatan protein anti apoptosis dari Bcl-2 *family* sebagai target intervensi untuk pengembangan terapi kanker. Dimana interaksi dengan protein anti apoptosis Bcl-2 *family* seperti Bcl-xl menjadi penting untuk aktivitas kematian dalam sel. Lebih lanjut hal ini dbuktikan oleh Mohammad, *et al.* (2005) bahwa molekul kecil yang berinteraksi dengan Bcl-xl akan berfungsi sebagai antagonis Bcl-xl dan akan mempromosikan apoptosis.

Ekspresi berlebihan dari Bcl-2/Bcl-xl pada kanker juga dapat meningkatkan resistensi terhadap kemoterapi dan radioterapi. Kuersetin salah satu flavonoid menunjukkan potensiasi efek antitumor dari doxorubicin dalam induksi apoptosis. *Co-treatment* kuersetin dan doxorubicin menunjukkan penurunan Bcl-xl yang signifikan, dimana kombinasi kuersetin dan doxorubicin merilis sitokrom c dari mitokondria ke sitosol lebih banyak dibandingkan dengan pengobatan doxorubicin tunggal. Hasil ini menunjukkan bahwa kuersetin mempotensiasi doxorubicin dalam induksi apoptosis pada sel kanker melalui jalur mitokondria dengan *down-regulation* Bcl-xl (Wang *et al.*, 2012). Rutin dalam penelitian ini terbukti secara *in silico* dapat menghambat Bcl-xl mungkin dapat dikembangkan menjadi agen pendamping kemoterapi untuk menurunkan resistensi kanker terhadap agen kemoterapi. Kemampuan rutin untuk berinteraksi dengan Bcl-xl berhubungan dengan kesesuaian struktur rutin dengan *native ligand* 4FC dari Bcl-xl yaitu pada atom C3, C4 dan A5. Perbedaan substitusi salah satunya pada posisi C3 suatu

flavonoid dapat menyebabkan perbedaan dalam interaksi dengan reseptor (Verma *et al.*, 2012). Hal ini diperkuat oleh Wang, *et al.* (2012) dimana pemberian tunggal kuersetin tidak mempengaruhi ekspresi dari Bcl-xl. Kuersetin merupakan bentuk aglikon dari rutin, dimana perbedaan rutin dengan kuersetin adalah substitusi pada posisi C3. Berdasarkan *molecular docking* menunjukkan bahwa adanya substitusi gugus hidroksil pada C3 berpotensi sebagai inhibitor untuk Bcl-xl.

Berdasarkan penelitian diatas dapat dilihat bahwa FEDW cukup prospektif untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif. Dikarenakan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dimana flavonoid diduga bertanggung jawab atas efek kemopreventif yang ditimbulkan. Pengkombinasian FEDW dengan agen kemoterapi diharapkan memberikan hasil yang baik untuk melihat efikasi kombinasi keduanya terhadap penghambatan pertumbuhan sel kanker, yaitu apakah sinergis, aditif, atau antagonis. Mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker HeLa sendiri tidak diteliti dalam penelitian ini, sehingga belum diketahui secara pasti mekanisme penghambatan FEDW terhadap sel HeLa. Kemungkinan mekanisme kemopreventif dari senyawa tersebut masih harus dibuktikan secara ilmiah menggunakan metode yang spesifik untuk mekanisme tersebut .